

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat yang Digunakan

1. Perkolator
2. Erlenmeyer 250 ml, 100 ml
3. Gelas kimia 250 ml, 150 ml, 50 ml
4. Satu set alat distilasi
5. Statip
6. Klem
7. Kaki tiga
8. Kawat kasa
9. Pengaduk
10. Termometer 110 ° C
11. Lampu spiritus
12. Corong
13. Corong pisah
14. Tabung reaksi
15. Gelas arloji
16. Labu ukur 100 ml
17. Gelas ukur 25 ml
18. Pipet panjang dan pendek
19. Alat kromatografi kolom

20. Alat penangas blok tembaga
21. Oven
22. Alat spektrofotometer ultra violet merk
"Hitachi", model 150-20
23. Alat spektrofotometer FTIR merk "SHIMATZU"

3.1.2. Bahan-bahan yang Digunakan :

1. H_2SO_4 pekat
2. Asam sulfat 2 N
3. Asam asetat anhidrid
4. Pelarut kloroform
5. Pelarut n-heksan
6. Air suling
7. Kalium bikromat
8. Pelarut etil-asetat
9. Amonium hidroksida
10. Pereaksi Mayer; Wagner; dan Dragendorff
11. Larutan $FeCl_3$ 1 %

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Determinasi Tanaman

Tanaman *Rhizophora mucronata* lamk. dibuat herbariumnya. Kemudian dibandingkan dengan data yang ada

di literatur, baik bentuk fisik daun, banyaknya daun dalam satu tangkai, banyaknya ruas jari, bentuk buah, bentuk bunga dan warnanya, bentuk pneumatophor, keadaan tumbuh/lingkungan tanaman, warna kulit batang dan bentuk akar/perakaran. Determinasi dilakukan menggunakan buku *Mangrove Vegetation* dari Chapman (1976).

3.2.2. Pembuatan Reagen

Reagen Mayer

Dalam erlenmeyer 100 ml dilarutkan Raksa (II)-Klorida sebanyak 1,36 gram dan pada tabung reaksi lainnya dilarutkan pula 5 gram Kalium Iodida (KI) dalam air suling sebanyak 10 ml. Setelah kedua larutan tersebut dicampurkan, kemudian diencerkan sampai volumenya menjadi 100 ml dengan air suling. Pereaksi ini akhirnya disimpan dalam botol yang berwarna coklat.

Reagen Wagner

Dalam 10 ml air suling dilarutkan Iodium sebanyak 2,54 gram dan Kalium Iodida sebanyak 2 gram, kemudian larutan ini diencerkan dengan air suling sampai volume keseluruhan menjadi 100 ml. Setelah disaring, pereaksi ini disimpan dalam botol yang berwarna coklat.

Reagen Dragendorff

Bismuth sub-nitrat, $\text{BiNO}_3(\text{OH})_2\text{BiO}(\text{OH})$, sebanyak 0,85 gram dilarutkan dalam campuran 10 ml asam asetat glasial dan 40 ml air suling, larutan tersebut kemudian dicampur dalam larutan Kalium Iodida sebanyak 8,0 gram dalam air suling sebanyak 20 ml. Suatu volume larutan tersebut diatas sebelum digunakan diencerkan terlebih dahulu dengan $\frac{2}{3}$ volume campuran asam asetat glasial sebanyak 20 ml dan 100 ml air suling. Pereaksi ini disimpan dalam botol yang berwarna coklat serta dilindungi dari cahaya dan hanya dapat digunakan untuk jangka waktu beberapa minggu saja. (Meiny Suzery, 1985).

Reagen Liebermann-Burchard

Reagen Liebermann-Burchard terdiri dari asam asetat anhidrid dan asam sulfat pekat. Untuk pemeriksaan triterpenoid digunakan 5 tetes asam asetat anhidrid dan 1 tetes asam sulfat pekat.

Pembuatan Pasir bebas Asam dan Basa

Pasir disaring sampai halus kemudian direndam dalam asam klorida pekat dan dicuci dengan aquades.

Lakukan berulang kali sampai pasir tampak jernih dan bebas dari asam-basa.

3.2.3. Pemeriksaan Kandungan Kimia Tumbuhan

Pengujian Adanya Alkaloid

Sampel kira-kira 4 gram dihaluskan dengan lumpang kemudian ditambahkan kloroform secukupnya sambil terus dihaluskan, setelah itu ditambahkan 10 ml NH_4OH dalam kloroform. Filtratnya diambil dengan jalan menyaring ke dalam tabung reaksi. Ke dalam cairan hasil saringan ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes, kemudian kocok dengan teratur. Cairan bagian atas (asam sulfat + alkaloid) dipipet dan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi ini ditambah pereaksi Mayer dan Wagner. Terjadinya endapan setelah penambahan pereaksi tersebut menunjukkan hasil pengujian yang positif (pereaksi Mayer memberikan endapan putih, pereaksi Wagner memberikan endapan coklat).

Sebagai standar dipakai larutan Brucin dalam asam klorida 2 N dengan konsentrasi, 0,01 % ; 0,025 %; 0,05 %; dan 0,1 % yang dianggap sebagai +; ++; +++; dan ++++.

Pengujian Adanya Golongan Triterpenoid dan Steroid

Sampel sebanyak 50-100 mgr. ditempatkan dalam tabung reaksi. Kemudian diekstrak dengan kloroform kira-kira 15 menit. Larutan hasil ekstrak dipipet dan ditempatkan dalam plat tetes sebanyak 10 tetes serta dibiarkan hingga kering. Setelah itu ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrid dan 1 tetes asam sulfat pekat.

Terbentuknya warna merah ungu menandakan adanya senyawa triterpenoid sedangkan terbentuknya warna biru menunjukkan adanya steroid.

Sebagai standar digunakan serbuk kolesterol (1,0 gram) dalam asam asetat anhidrid ditambah asam sulfat pekat, ini dianggap sebagai +++ untuk senyawa steroid, sedangkan untuk senyawa triterpenoid digunakan biji mahoni (*Swietenia macrophylla*) sebagai +++ dengan kandungan 0,05 % triterpenoid.

Pengujian Adanya Senyawa Saponin

Sampel kira-kira 2 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan air hingga seluruh sampel terendam dan kemudian dididihkan kira-kira 2-3 menit dan didinginkan dan dikocok kuat-kuat. Adanya buih yang stabil setelah pengocokan selama

30 menit menunjukkan adanya saponin. Sebagai pembanding untuk saponin digunakan lidah buaya (*Aloe spec.*). Ukuran + ; ++ ; +++ diberikan berdasarkan tinggi busa yang dihasilkan berturut-turut 1, 2, dan 3 cm.

Pengujian Adanya Senyawa Fenol

Sampel ditambah dengan air suling kemudian dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ke dalam tabung reaksi ini ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam menunjukkan adanya hasil yang positif.

Hasil analisis skrining fitokimia terhadap seluruh bagian dapat dilihat dalam tabel IV.1.

3.2.4. Pembuatan Ekstrak

Bahan berupa daun yang telah ditumbuk halus (1,5 Kg.), dimaserasi dengan pelarut kloroform selama 5 x 24 jam. Ekstrak kloroform dikisatkan sampai semua kloroform menguap, kemudian ekstrak kental diekstraksi dengan pelarut n-heksan. Ekstrak n-heksan diuji dengan pereaksi Liebermann-

Burchard, hasil ekstraksi menunjukkan warna merah ungu dan warna biru yang tajam. Lihat skema kerja ekstraksi daun *Phizophora mucronata* Lamk. pada lampiran 1.

3.2.5. Analisis Hasil Ekstraksi dengan KLT

Dari ekstraksi menggunakan pelarut n-heksan dianalisis dengan kromatografi lapis tipis dengan berbagai eluen seperti kloroform, n-heksan, etanol, etil asetat, kloroform-etil asetat (1:1); (5:1); (9:1), sebagai adsorben digunakan silika gel G 60.

Identifikasi Kromatogram

Identifikasi kromatogram menggunakan uap Iodium. Serbuk I_2 dimasukkan ke dalam sebuah tabung gelas dan dijenuhkan beberapa saat, kemudian kromatogram dimasukkan ke dalam tabung gelas tersebut. Diamkan beberapa saat, akan muncul noda kecoklatan. Rf dihitung dengan mengukur jarak yang ditempuh zat terlarut dibandingkan dengan jarak yang ditempuh zat pelarut.

3.2.6. Isolasi dan Pemurnian Hasil Ekstraksi

Dari hasil analisis menggunakan kromatografi

lapis tipis terhadap ekstrak n-heksan didapatkan pelarut yang terbaik untuk pemisahan komponen, yaitu eluen kloroform-etil asetat (9:1) yang selanjutnya digunakan untuk pemisahan kromatografi kolom.

Tahap Pembuatan Kolom

Sebelum digunakan kolom kromatografi perlu mendapatkan perlakuan untuk menghilangkan lemak, yaitu dengan merendamnya dalam kalium bikromat dan asam sulfat pekat, lalu dicuci dengan detergen dan air suling dan dikeringkan.

Silika gel G 60 sebagai adsorben diaktifkan pada suhu 110°C dalam oven kemudian didinginkan, lalu dibuat bentuk bubuk dengan pelarut kloroform-etil asetat (9:1).

Kolom diklem dengan posisi vertikal, bagian bawah dari kolom diberi kapas dan pasir yang telah bebas dari asam dan basa. Isi kolom kira-kira setengahnya dengan pelarut tersebut, kemudian dimasukkan bubuk silika gel tadi ke dalamnya sedikit demi sedikit sambil mengetuk-ketuk dinding kolom.

Penuhkan kolom dengan pelarut, kemudian buka

kran sehingga pelarut keluar. Lakukan berulang kali agar molekul silika gel menjadi padat.

Tahap Pemisahan Komponen

Ekstrak n-heksan dikeringkan kemudian ditimbang sebanyak 0,8 gram, digerus halus dengan sebagian silika gel dan dituangkan diatas kolom. Sebagai pengelusi digunakan CHCl_3 -etil asetat (9:1).

Dari hasil kromatograafi kolom didapatkan 4 fraksi; fraksi I (botol 1 dan 2) menunjukkan bercak tunggal, fraksi II (botol 3) menunjukkan tiga bercak, fraksi III (botol 4 dan 5) menunjukkan dua bercak dan fraksi IV (botol 6-15) menunjukkan bercak tunggal, fraksi V (botol 16-52) tidak menunjukkan bercak, atau uji KLT negatif.

Masing-masing fraksi diuji dengan reagen Liebermann-Burchard menunjukkan hasil fraksi I berwarna biru, fraksi II menunjukkan warna biru dan sedikit merah ungu, fraksi III menunjukkan warna merah ungu dan biru yang samar, fraksi IV menunjukkan warna coklat, fraksi V tidak menunjukkan warna. Kemudian untuk fraksi III dan IV diuapkan pelarutnya dan dikristalisasi dengan menambahkan sedikit kloroform dan etanol berlebih. Dari fraksi III didapatkan endapan putih semu

coklat, sedangkan dari fraksi IV tidak didapatkan endapan. Endapan dari fraksi III dimurnikan dengan penambahan etanol panas berulang kali sampai didapatkan endapan putih. Padatan yang diperoleh berwarna putih tak berbentuk (amorf) sebanyak 2,8 mgr.

3.2.7. Analisis Hasil Isolasi dengan Kromatografi Lapis Tipis dan Uji Titik Leleh

Padatan sebanyak 2,8 mgr. diambil sedikit kemudian dilarutkan dalam kloroform dan dikromatografi lapis tipis dengan pengembang kloroform-etil asetat (9:1), diperoleh satu noda dengan $R_f = 0,6667$. Hasil pengujian titik leleh dengan alat penangas blok tembaga diperoleh titik leleh $273-275^{\circ} \text{C}$.

3.2.8. Analisis Spektroskopi senyawa Hasil Isolasi

Spektrofotometer Ultra Violet

Dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer ultra violet merk "Hitachi", model 150-20 diperoleh panjang gelombang (λ) maks dalam pelarut kloroform, yaitu : 307,6 nm (1,186); 304,4 nm (1,181); 299,6 nm (1,189); 251,2 nm (0,257); 238,8

nm (0,523); 235,2 nm (0,459); 224,4 nm (0,480);
222,4 nm (0,477); 220,0 nm (0,483); 216,0 nm
(0,476); 203,2 nm (0,499).

Spektrofotometer Infra Merah

Dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer
FTIR merk "Shimatzu", dengan pelet KBr, memberikan
serapan pada bilangan gelombang ($\tilde{\nu}$) cm^{-1} :

2939,3 cm^{-1} ; 2866,0 cm^{-1} ; 2362,6 cm^{-1} ; 1703,0 cm^{-1} ;
1606,6 cm^{-1} ; 1514,0 cm^{-1} ; 1453,1 cm^{-1} ; 1203,3 cm^{-1} ;
1168,8 cm^{-1} ; 999,1 cm^{-1} ; 829,3 cm^{-1} .

